

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(4)

(11)Publication number : 09-313058

(43)Date of publication of application : 09.12.1997

(51)Int.Cl.	A01H 4/00
	C12N 5/04

(21)Application number : 08-134499	(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD
------------------------------------	---

(22)Date of filing : 29.05.1996	(72)Inventor : SUGIMURA KENICHIRO KADOWAKI TOMOKO FUJITA TAKASHI HATAMOTO HITOSHI
---------------------------------	--

(54) PRODUCTION OF CYCLAMEN TUBER-LIKE BODY**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To effectively obtain a cyclamen tuber-like body high in germination rate and excellent in character stability by culturing the stalks of the cyclamen in a liquid culture medium high in the concentration of a saccharide.

SOLUTION: This method for producing a cyclamen tuber body comprises subculturing the stalks of the cyclamen or an enlarged tissue obtained by culturing the stalks of the cyclamen in a liquid culture medium. Therein, the concentration of a saccharide such as sucrose in the used liquid culture medium is once enhanced to e.g. 30-50g/liter. The concentration of the saccharide in the liquid culture medium used on the production of the enlarged tissue by the liquid culture of the stalks of the cyclamen is preferably enhanced to 2-3 times.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-313058

(43) 公開日 平成9年(1997)12月9日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 H 4/00			A 0 1 H 4/00	
C 1 2 N 5/04			C 1 2 N 5/00	F

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平8-134499	(71) 出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(22) 出願日	平成8年(1996)5月29日	(72) 発明者	杉村 謙一郎 埼玉県川越市新宿町5-11-3
		(72) 発明者	門脇 知子 埼玉県所沢市上新井132-3-310
		(72) 発明者	藤田 孝 埼玉県日高市大字高萩450-15
		(72) 発明者	畑本 均 埼玉県川越市大字並木241-1-A402

(54) 【発明の名称】 シクラメン塊茎様体の製造法

(57) 【要約】

【課題】 発芽率の高いシクラメン塊茎様体の製造法を提供する。

【解決手段】 シクラメンの葉柄を液体培養して塊茎様体を誘導する際に使用する液体培地中の糖質濃度を培養中に一旦高めることにより、発芽率の高いシクラメン塊茎様体を得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 シクラメンの葉柄を液体培養して塊茎様体を誘導する際に使用する液体培地中の糖質濃度を一旦高めることを特徴とする発芽率の高いシクラメン塊茎様体の製造法。

【請求項2】 シクラメンの葉柄を液体培養して得られる肥大組織を継代培養する際に使用する液体培地中の糖質濃度を一旦高める請求項1記載の製造法。

【請求項3】 液体培地中の糖質濃度を、シクラメンの葉柄を液体培養して肥大組織を得る際に使用する液体培地中の糖質濃度を2～3倍に高める請求項2記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、発芽率の高いシクラメン塊茎様体を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】シクラメンの場合、自殖交配を繰り返すと草勢が劣化する等の自殖弱勢が顕著に起こり、遺伝的に固定したいわゆる純系の個体が得られないので、個体間の交配により種子を生産するという従来の増殖法では、花色や花形等の重要な形質を固定化することができず、親株と同じ性質を有する個体を安定して得ることができないという問題がある。そして、このような問題を解決するために遺伝的に形質を揃える栄養繁殖の技術が開発されており、シクラメンの植物体組織を培養して不定芽を分化させた後に幼苗を形成させる増殖法がいくつか知られている。

【0003】安藤らは、暗黒条件下で葉柄部分を徒長させることにより得られる黄化葉柄を用いたシクラメンの増殖法を提案している（千葉大学園芸学部報告，vol.32, pp.1-5, 1983）。また、大橋らは、種子を殺菌した無菌幼植物からシクラメンを増殖させる方法を検討している（栃木県農業試験所研究報告，No.36, pp.93-108, 1989）。しかし、これらの不定芽を分化させることによりシクラメンを増殖させる方法は、いずれも固形培地のみを使用する方法であり、効率が悪い。

【0004】市橋らは、固形培地上で誘導した不定芽を外植片とし、これを液体培養することにより塊茎様体を誘導する方法を検討し、固形培地のみを使用する方法よりも効率良くシクラメンを増殖させる方法を提案している（岐阜県農業総合研究センター研究報告，no.5, pp.1-23, 1992）。しかし、この液体培養による方法でも塊茎様体の発芽率は低い。

【0005】

【発明が解決しようとしている課題】本発明者らは、シクラメンを効率的に増殖させる方法について、鋭意、研究を進めていたところ、シクラメンの葉柄を液体培養して塊茎様体を誘導する際に、液体培地中の糖質濃度を培養中に変化させることにより、発芽率の高いシクラメン

塊茎様体を得ることができることを見出した。そして、この塊茎様体を栽培することにより、シクラメンを効率的に増殖させることに成功した。したがって、本発明は、シクラメンの葉柄から誘導した発芽率の高い塊茎様体を製造する方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明では、シクラメンの葉柄を液体培養して塊茎様体を誘導する際に使用する液体培地中の糖質濃度を一旦高めることにより、発芽率の高いシクラメン塊茎様体を得る。

【0007】本発明で使用することができるシクラメンの品種としては、ヒクトリア、バーバーク、ピュアホワイト、バステル、ミニシクラメン等を例示することができるが、これらの品種に限定されるものではない。また、外植片として液体培養に供することができる葉柄としては、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液等で表面を殺菌した開花株の葉柄、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液等で表面を殺菌した種子を無菌的に固形培地等へ播種して得られる無菌幼植物の葉柄、無菌幼植物の各組織を培養して得られる不定芽の葉柄、あるいは、開花株の葉柄、葉身、蕾内組織等を培養して得られる不定芽の葉柄等を例示することができる。なお、不定芽は、例えば、無機塩成分を1/3としたMurashige & Skoog 培地（MS培地）に0～2.0mg/l 濃度の α -ナフタレン酢酸（NAA）及び0.1～2.0mg/l 濃度のベンジルアミノプリン（BA）を添加し、シヨ糖濃度を20～60g/l、好ましくは30～50g/l となるよう調整し、3g/lとなるようゼランガムを加えた固形培地に、無菌幼植物や開花株の各器官を置床して誘導することができる。

【0008】この葉柄を液体培養することにより塊茎様体を誘導する。例えば、第1段階として、硝酸アンモニウム、硝酸カリウム及び微量元素成分を1/2としたMS培地（修正MS培地）に0.05～6.0mg/l 濃度のNAA及び0～2.0mg/l 濃度のBAを添加し、シヨ糖濃度を20～40g/l となるよう調整した液体培地に、葉柄を1～4mm幅の輪切り状に切断した10～20片を懸濁し、20℃、弱光下、1分間に60往復振盪で20日間培養して肥大組織を得る。第2段階として、修正MS培地に0.01～1.0mg/l 濃度のNAA及び0.1～0.2mg/l 濃度のBAを添加し、シヨ糖濃度を第1段階の2～3倍量に高めた液体培地に、肥大組織を継代して同様の条件で30日間振盪培養する。第3段階として、修正MS培地に0～0.04mg/l 濃度のNAA及び0.2～0.5mg/l 濃度のBAを添加し、シヨ糖濃度を第1段階と同じ濃度に調整した液体培地に継代して同様の条件で14日間振盪培養して塊茎様体を得ることができる。

【0009】このように、葉柄を培養して得られる肥大組織を継代培養する際に使用する液体培地の糖質濃度を一旦高めることにより、発芽率が高く形質が安定したシクラメン塊茎様体を得ることができる。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明では、シクラメンの葉柄を外植片として、これを液体培養して塊茎様体を得る。

【0011】液体培養に使用することができる液体培地としては、Murashige & Skoog 培地 (MS 培地)、White 培地、Lismaier & Skoog 培地、Gamborg の B5 培地等の組織培養用培地を例示することができる。特に、MS 培地、無機塩成分を $1/3$ とした MS 培地、あるいは、硝酸アンモニウム、硝酸カリウム及び微量元素成分を $1/2$ とした MS 培地 (修正 MS 培地) 等を使用することが好ましい。

【0012】液体培養に使用する培地に添加する植物ホルモンとしては、 α -ナフタレン酢酸 (NAA)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、インドール酢酸等のオーキシニン類やベンジルアミノプリン (BA)、カイネチン、ゼアチン等のサイトカイニン類を例示することができるが、好ましくは、 $0 \sim 6.0 \text{ mg/l}$ 濃度の NAA 及び $0 \sim 6.0 \text{ mg/l}$ 濃度の BA を培地に添加する。

【0013】液体培養に使用する培地の炭素源としては、ショ糖やブドウ糖等の糖質を例示することができるが、好ましくはショ糖を使用する。なお、糖質濃度は、液体培養第1段階 (培養期間10～20日) では $20 \sim 40 \text{ g/l}$ とし、液体培養第2段階 (培養期間20～30日) では第1段階の糖質濃度の2倍量以上とする。そして、液体培養第3段階 (培養期間7～14日) では液体培養第1段階と同程度の糖質濃度で培養すると良い。

【0014】液体培地は、pH を $4.0 \sim 7.0$ 、好ましくは 5.8 に調整する。そして、液体培養は、 $15 \sim 30^\circ\text{C}$ 、好ましくは $20 \sim 25^\circ\text{C}$ に設定して行う。なお、液体振盪培養は、光照射条件下 ($500 \sim 5,000$ ルックス、好ましくは $1,000 \sim 2,000$ ルックス) で行っても良いし暗黒条件下で行っても良い。また、往復振盪培養機を使用して1分間に $30 \sim 100$ 往復振盪、好ましくは1分間に $50 \sim 60$ 往復振盪で行う。

【0015】このようにして得られたシクラメンの塊茎様体を発芽用培地に置床し、30日間程度培養して発芽させる。なお、培養に使用する発芽用培地としては、例えば、無機塩成分を $1/3$ とした MS 培地に $0 \sim 0.02 \text{ mg/l}$ 濃度の NAA 及び $0 \sim 0.4 \text{ mg/l}$ 濃度の BA を添加し、ショ糖濃度を $30 \sim 50 \text{ g/l}$ となるよう調整し、 3 g/l となるようジェランガムを加えた固形培地を使用すれば良い。

【0016】そして、第1段階として、発芽したシクラメンの塊茎様体を発根用培地に置床して20日間程度培養した後、第2段階として、NAA 無添加の発根用培地に継代して20日間程度培養することにより発根したシクラメン苗を得ることができる。なお、第1段階の培養に使用する発根用培地としては、例えば、無機塩成分を $1/4$ とした修正 MS 培地に $0.02 \sim 2.0 \text{ mg/l}$ 濃度の NAA を添加し、ショ糖濃度を 7.5 g/l となるよう調整して、 5 g/l となるようジェランガムを加えた固形培地を使用すれば

良く、第2段階の培養に使用する発根用培地としては、NAA を含まない以外は第1段階で使用した発根用培地と同様の組成の固形培地を使用すれば良い。

【0017】以下に実施例に示し、本発明を具体的に説明する。

【実施例1】

無菌幼植物の育成

シクラメン (品種: ピクトリア) の種子を有効塩素濃度 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に10分間浸漬し、殺菌処理を行った。次いで、この種子を滅菌水で3回洗浄後して表面の次亜塩素酸ナトリウムを取り除いた。これを MS 培地の無機塩成分を3分の1濃度に希釈した培地に、ショ糖を 30 g/l 加え、pH 5.8 とし、ジェランガムを 3 g/l 加えてオートクレーブで滅菌処理した固形培地に置床し、 20°C 、暗所の条件で50日間培養した。

【0018】塊茎様体の形成

幼植物の葉柄を、メスを用いて約 2 mm 幅に切断した。まず、第1段階として、修正 MS 培地に NAA を 4.7 mg/l 、BA を 1.1 mg/l 添加し、これにショ糖を 30 g/l 加え、pH 5.8 としオートクレーブで滅菌処理した液体培地 40 ml を 100 ml 容の三角フラスコにいれた。ここに前述により得た葉柄片を $10 \sim 20$ 片を懸濁して、 20°C 、弱光下 60 往復振盪で30日間培養し、肥大組織を得た。次に、第2段階として、修正 MS 培地に NAA を 1.0 mg/l 、BA を 0.2 mg/l 添加し、これにショ糖を 60 g/l 加え、pH 5.8 としオートクレーブで滅菌処理した液体培地に前述により得た肥大組織を継代し、20日間振盪培養した。その後、第3段階として、修正 MS 培地に NAA を 0.04 mg/l 、BA を 0.2 mg/l 添加し、これにショ糖を 30 g/l 加え、pH 5.8 としオートクレーブで滅菌処理した液体培地に継代し、14日間振盪培養して塊茎様体を得た。

【0019】塊茎様体の発芽

次に、無機塩成分のみ3分の1濃度に希釈した MS 培地に BA を 0.2 mg/l 添加し、これにショ糖を 30 g/l 加え、pH 5.8 とし、ジェランガムを 3 g/l 加えてオートクレーブで滅菌処理した発芽用培地に前述で得られた塊茎様体を置床した。30日間培養し、発芽した塊茎様体の割合を算出して表1に示した。

【0020】

【比較例1】液体培地のショ糖濃度が全て 30 g/l である以外は、上記実施例と同様にして培養し、発芽した塊茎様体の割合を算出して表1に示した。

【0021】

【比較例2】上記実施例の第2段階で用いる液体培地の糖濃度が第1段階で用いる液体培地の糖濃度の 1.5 倍である 45 g/l である以外は、上記実施例と同様にして培養し、発芽した塊茎様体の割合を算出して表1に示した。

【0022】

【比較例3】上記実施例の第2段階で用いる液体培地の糖濃度が第1段階で用いる液体培地の糖濃度の 4.5 倍で

ある135g/7である以外は、上記実施例と同様にして培養し、発芽した塊茎様体の割合を算出して表1に示した。

【0023】

【表1】

	発芽率 (%)	
	個体1	個体2
実施例1	100.0	66.0
比較例1	0.0	33.0
比較例2	23.0	45.0
比較例3	12.0	38.0

10

発芽率 (%) = { (発芽した塊茎様体数) / (培地に置

床した塊茎様体数) } × 100

【0024】

【発明の効果】本発明の方法により得られるシクラメンの塊茎様体は、発芽率が高いので、形質が安定したシクラメンの苗を効率的に得ることができる。